

На правах рукописи

МУЗЫКАНТОВ Алексей Александрович

**АДАПТАЦИЯ МИКОПЛАЗМ (*MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* S6)
К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ**

03.00.04 - биохимия

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань-2008

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ патогенеза Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук
Чернова Ольга Александровна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Мелентьев Александр Иванович
(Институт биологии РАН, г.Уфа)

кандидат биологических наук, доцент
Гимадутдинов Олег Александрович
(Казанский Государственный Университет
им. Ульянова-Ленина, г.Казань)

Ведущая организация: Институт биохимии им. А.Н.Баха
РАН, г.Москва

Защита состоится "__" октября 2008 года в "____" часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан "__" сентября 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Абрамова З.И.

Актуальность проблемы. Выяснение механизмов, обеспечивающих выживание микоплазм (класс Mollicutes) в разных условиях среды, представляет значительный интерес как с точки зрения фундаментальных исследований, так и практических разработок, связанных с определением молекулярных основ формирования и эволюции системы "паразит-хозяин" и способов её контроля [Борхсениус и др., 2002; Razin *et al.*, 2006].

Большой объем экспериментальных и теоретических данных, полученных в разных лабораториях мира за последние годы, значительно расширил представления о биологии мельчайших бесстеночных бактерий, способных к самостоятельному воспроизведению. Однако в исследовании адаптации этих бактерий к биогенным и абиогенным стрессорам сделаны лишь первые шаги [Чернов и др., 2005, 2007; Cecchini *et al.*, 2007]. Было обнаружено, что адаптация "вездесущей" микоплазмы *Acholeplasma laidlawii* к неблагоприятным условиям (ограничению по субстрату и понижению температуры) связана с превращением вегетативных форм (ВФ) клеток микоплазмы в некультивируемые формы (НФ) и показано, что ВФ и НФ *A. laidlawii* существенно различаются по морфологии, ультраструктуре, экспрессии генома и патогенности [Чернов и др., 2004; Chernov *et al.*, 2007]. Изменения размеров, морфологии, ультраструктуры, пролиферации и вирулентности клеток, возникающих при неблагоприятных условиях роста у аспорогенных бактерий, описаны в ряде работ [Головлев и др., 1998; Вайнштейн, Кудряшова, 2000; Oliver, 2005]. Однако соответствующие процессы у разных видов микоплазм не изучены.

Уникальным видом микоплазм с точки зрения адаптивных способностей является *Mycoplasma gallisepticum*. Эта микоплазма, известная как возбудитель болезней птиц и контаминант создаваемых на основе куриных эмбрионов вирусных вакцин, встречается также у растений [Коромыслов и др., 1987; McGarrity *et al.*, 1992]. Контроль и подавление инфекций, вызываемых *M. gallisepticum*, представляют серьезную проблему, решение которой связывают с успехами изучения молекулярной и клеточной биологии микоплазмы, определяющей адаптацию бактерий к неблагоприятным условиям (НУ) среды и патогенность.

Цель данной работы - выяснить особенности адаптации *M. gallisepticum* S6 к неблагоприятным условиям среды.

Основные задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ морфологии, ультраструктуры и пролиферации клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся на полноценной питательной среде и в неблагоприятных условиях (ограничение по субстрату и понижение температуры) культивирования.
2. Провести сравнительный анализ амплификации нуклеотидных последовательностей ряда генов клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования.
3. Провести сравнительный анализ полипептидов клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования.

4. Провести сравнительный анализ ДНК-повреждающего действия клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования.

5. Провести сравнительный анализ фитопатогенности клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования.

Научная новизна. Впервые установлено, что адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ сопровождается переходом ВФ клеток микоплазмы в НФ. ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6 существенно различаются по морфологии и ультраструктуре.

Впервые показано, что ВФ клеток *M. gallisepticum* S6 проявляют генотоксичность в отношении тестерного штамма *E. coli* PQ37, тогда как НФ микоплазмы в отношении соответствующего штамма бактерии ДНК-повреждающего действия не оказывают.

Впервые определена полная нуклеотидная последовательность гена *pvrA*, кодирующего фазовариабельный белок цитoadгезии *M. gallisepticum* S6, у ВФ и НФ микоплазмы.

Впервые показано, что переход ВФ в НФ *M. gallisepticum* S6 связан с изменением топологии, структуры ДНК и экспрессии белков в клетках микоплазмы. Идентифицировано 63 белка, участвующие в адаптации *M. gallisepticum* S6 к НУ и составлена схема возможных изменений метаболических путей в клетках микоплазмы при культивировании их в НУ среды.

Впервые установлено, что *M. gallisepticum* S6 обладает фитопатогенным потенциалом и показано, что адаптация к НУ сопровождается изменением вирулентных свойств микоплазмы.

Научно-практическая значимость. Полученные данные вносят вклад в понимание адаптации *M. gallisepticum* S6 к неблагоприятным условиям среды. Результаты работы могут служить основой для развития новых подходов к определению молекулярных механизмов формирования и эволюции системы "паразит-хозяин", а также способов контроля микоплазменных инфекций.

Разработаны методы исследования процесса адаптации к НУ среды *M. gallisepticum* S6 *in vitro*. Предложен молекулярно-генетический зонд для дифференциальной диагностики ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6 – высокопатогенной для птиц микоплазмы, являющейся контаминантом создаваемых на основе куриных эмбрионов вирусных вакцин, способной также инфицировать растения.

Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в медицинских, ветеринарных, сельскохозяйственных, биологических и биотехнологических учреждениях, занимающихся разработкой способов диагностики и контроля микоплазменных инфекций, а также в учебном процессе, в том числе курсах лекций по биохимии, молекулярной биологии, микробиологии, стрессологии и физиологии растений в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа в 2005-2008 гг. проводилась в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме "Взаимодействие микоплазм

с высшими организмами на молекулярно-генетическом уровне" (№ гос. рег. 0120.0 603845). Исследования автора, как исполнителя данной темы, поддержаны грантами ГК № 02.512.11.2067 в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России" на 2007-2012 годы по приоритетным направлениям "**Живые системы**" по теме "Сравнительный протеомный анализ вегетативных форм и наноклеток *Mycoplasma gallisepticum* для создания технологии контроля микоплазменных инфекций" и РФФИ 08-04-01047-а "Молекулярные основы адаптации микоплазм (*M. gallisepticum*) к биогенным и абиогенным стрессорам: белки наноформ и их гены", 2008-2010 гг., а также грантами **ведущей научной школы** (руководитель **акад. И.А. Тарчевский**) № НШ-6042; № НШ-5399,2008,4. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Синтез праймеров, секвенирование нуклеотидных последовательностей, двумерный электрофорез и идентификацию полипептидов проводили на базе ФГУ НИИ физико-химической медицины Минздрава РФ; оценку генотоксичности клеток *M. gallisepticum* S6 и наноскопию молекул ДНК – на базе КГУ (биолого-почвенный факультет, кафедра микробиологии и физический факультет, кафедра оптики и нанофотоники, соответственно).

Благодарности: Приношу глубокую благодарность научному руководителю д.б.н. О.А. Черновой за неоценимую помощь в выборе данного направления исследований, за внимательное и оперативное решение проблем, возникавших по ходу выполнения и написания диссертации, за постоянную заботу и поддержку; приношу искреннюю благодарность д.б.н., проф. В.М. Чернову заведующему лабораторией молекулярных основ патогенеза КИББ КазНЦ РАН и к.б.н. О.В. Горшкову за неоценимую помощь в выполнении исследований; выражаю искреннюю благодарность к.б.н. М.В. Трушину, к.б.н. Г.Ф. Шаймардановой, к.б.н. Т.Н. Нестеровой, к.б.н. А.А. Пономаревой КИББ КазНЦ РАН за всестороннюю помощь в проведении работ и анализе полученных данных; выражаю искреннюю благодарность д.б.н., проф. О.Н. Ильинской, к.б.н. А.Б. Маргулис, асп. А.Д. Пельникевич КГУ, а также д.б.н., проф. В.М. Говоруну, к.б.н. В.Н. Лазареву, к.б.н. И.А. Деминой, к.х.н. Т.А. Акопиан, асп. Ю.И. Басовскому ФГУ НИИ физико-химической медицины Минздрава РФ за предоставленные возможности проведения совместных работ и ценные советы при обсуждении результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Клетки *M. gallisepticum* S6, выращенные на полноценной питательной среде и в неблагоприятных условиях – при ограничении субстрата и понижении температуры, - имеют существенные различия по морфологии и ультраструктуре. Длительное культивирование *M. gallisepticum* S6 в неблагоприятных условиях приводит к превращению **вегетативных форм** (ВФ) клеток микоплазмы в **некультивируемые формы** (НФ).

2. Переход ВФ в НФ *M. gallisepticum* S6 связан с изменением топологии и структуры ДНК микоплазмы.

3. ВФ и НФ клеток *M. gallisepticum* S6 различаются по экспрессированным белкам.

4. Клетки *M. gallisepticum* S6 проявляют фитопатогенность в отношении специфического и неспецифического индикаторов фитомикоплазмозов.

5. Адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ сопровождается изменениями генотоксичности, а также фитопатогенности микоплазмы.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на 11-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пущино, 2007), XII Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 150-летию со дня рождения В.М. Бехтерева (Казань, 2007), Всероссийской конференции "Фундаментальные аспекты исследования симбиотических систем" (Саратов, 2007), Итоговой конференции Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН (Казань, 2007), Итоговой конференции в рамках приоритетного направления "Живые системы" (Москва, 2007), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), I Всероссийском, с международным участием, конгрессе студентов и аспирантов - биологов "Симбиоз - Россия - 2008" (Казань, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы. В работе представлено 9 таблиц и 24 рисунка. Список цитируемой литературы содержит 286 источников, из них 72 – в отечественных изданиях.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы исследований

В работе был использован штамм *Mycoplasma gallisepticum* S6, полученный из коллекции микроорганизмов Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (РАМН, Москва). Культуру клеток *M. gallisepticum* S6 после музейного хранения выращивали при 37° С в жидкой питательной среде Эдварда, с модификациями [Борхсениус и др., 2002].

Для получения культуры *M. gallisepticum* S6, адаптированной к неблагоприятным условиям, и реверсии использовали методы индукции некультивируемого состояния у *A. laidlawii* PG8 и пробуждения клеток ахолеплазмы из некультивируемого состояния в активно пролиферирующую культуру [Чернов и др., 2004, 2005], соответственно.

Оценку числа жизнеспособных клеток в популяции *M. gallisepticum* S6 проводили путем подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 0,3% агаризованной питательной среде (метод Коха) и методом предельных разведений (МПР) в жидкой питательной среде [Пименова и др., 1983], с учетом особенностей культивирования микоплазмы [Борхсениус и др., 2002].

Целостность плазматической мембраны клеток *M. gallisepticum* S6 определяли по ее проницаемости для красителей: метиленового синего и бромистого этидия [Ильинская и др., 2006]. Препараты анализировали на конфокальном микроскопе LSM 510 META ("Carl Zeiss", ФРГ). Наблюдения проводили в 5 полях зрения для каждого образца.

Трансмиссивную электронную микроскопию проводили согласно Cole [1983]. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (Швеция). Образцы просматривали на электронном микроскопе JEM-1200EX (Япония).

Выяснение токсичных и генотоксичных эффектов клеток *M. gallisepticum* S6 и их культуральной жидкости проводили по Quillardet *et al.* [1982].

Выделение ДНК из клеток микоплазм и тканей растений осуществляли с помощью метода фенольной экстракции [Маниатис и др., 1984]. Дополнительно препараты ДНК обрабатывали РНКазой ("Serva", ФРГ) и протеиназой К ("Sigma", США).

Атомно-силовую микроскопию образцов ДНК *M. gallisepticum* S6 проводили по Braga, Ricci [2004]. Исследование образцов ДНК проводили на атомно-силовом микроскопе Solver P47H ("НТ-МДТ", Россия). Для обработки данных использовали программу Nova 1.0.26 RC1 (разработчик - НТ-МДТ, Россия).

Направленную амплификацию фрагментов ДНК *M. gallisepticum* S6 посредством ПЦР проводили с использованием праймеров, синтезированных на основе известных нуклеотидных последовательностей генов (*himA/hup*, *pvpA*, *rpoD*, *recA*, *dnaB*) *M. gallisepticum* R_{low} [Papazisi *et al.*, 2003]. Олигонуклеотиды синтезировали в НПО "ЛИТЕХ" (г. Москва). Анализ продуктов ПЦР проводили с помощью электрофоретического разделения фрагментов ДНК в 2% агарозном геле ("Helicon", Россия) с последующим окрашиванием бромистым этидием (10 мг/мл).

Клонирование фрагментов ДНК *M. gallisepticum* S6 в плазмиде pGEM-T Easy Vector ("Promega", США) осуществляли согласно инструкции изготовителя. Трансформацию проводили с помощью электропорации в ампициллин-резистентный штамм *E. coli* DH5α.

Секвенирование фрагментов ДНК осуществляли с помощью автоматического секвенатора ABI 3130 ("Applied Biosystems", США), согласно инструкции изготовителя на базе лаборатории протеомного анализа ФГУ НИИ физико-химической медицины Минздрава РФ (г. Москва).

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием пакетов программ Informax Vector NTI Suite 9 и DNAMAN 4.0. Поиск доменов проводили в BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), SwissProt (<http://cn.expasy.org/>), BLOCKs (<http://blocks.fhcrc.org/>), Prosite (<http://cn.expasy.org/prosite/>), Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Подготовку препаратов, двумерный электрофорез и идентификацию белков проводили по Говоруну и др. [2003], Blum *et al.* [1987] и Görg *et al.*

[2000] на базе лаборатории протеомного анализа ФГУ НИИ физико-химической медицины Минздрава РФ (г. Москва).

Белки, выделенные из ВФ и НФ клеток *M. gallisepticum* S6, составляли контрольную и опытную группы, соответственно. Белки идентифицировали по массам протеолитических фрагментов с использованием программы Mascott Peptide Fingerprint (Matrix Science, США) и базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>), содержащей полную последовательность генома *M. gallisepticum* R_{low} [Papazisi *et al.*, 2003].

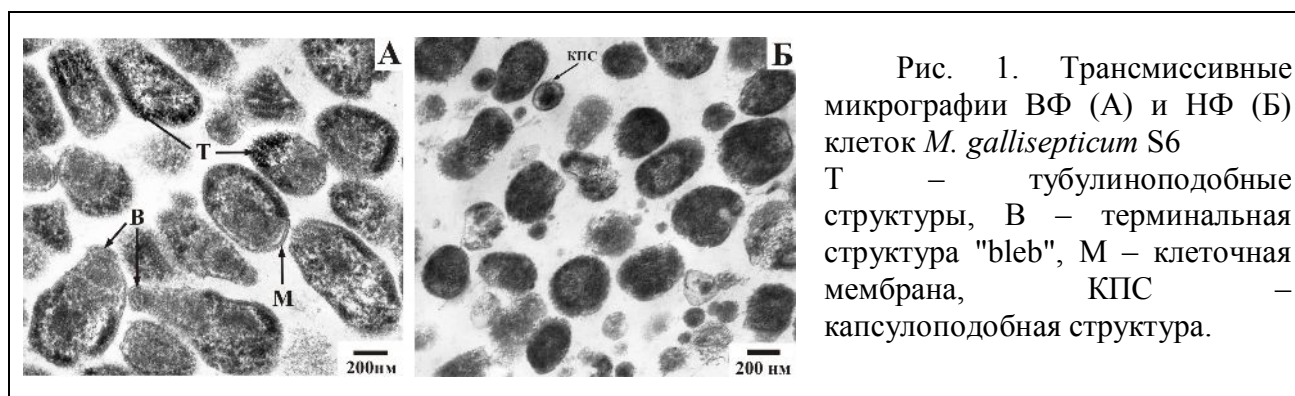
Инфицирование растений (*Vinca minor* L. и *Vigna radiata* L.) клетками *M. gallisepticum* S6 проводили по Чернову и др. [2007] спонтанным заражением 3-х дневных проростков растений через корневую систему посредством инкубирования корешков растений в течение 24 часов в растворах фосфатно-солевого буфера, содержащих и не содержащих клетки *M. gallisepticum* S6, для опытных и контрольных растений, соответственно.

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов расчета среднеквадратичного отклонения и сравнения средних по критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel 2002. Критерий вероятности $P < 0,05$ принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных [Лакин, 1990].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

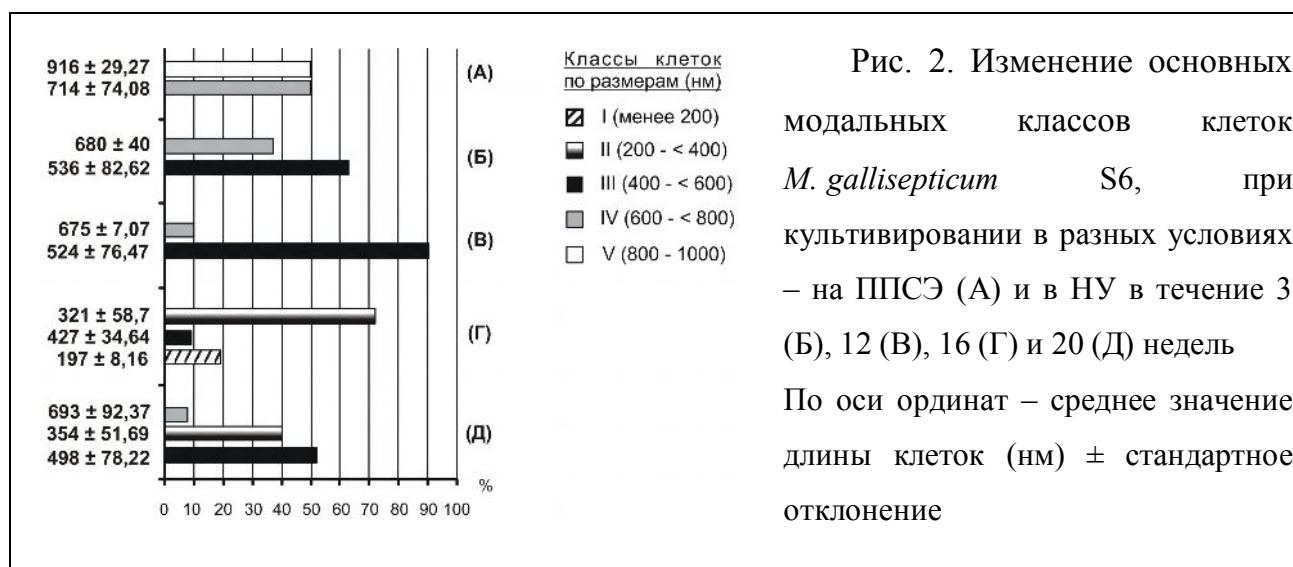
2.1. Особенности морфологии, ультраструктуры и пролиферации клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования

В результате сравнительного анализа трансмиссивных микрографий было обнаружено, что морфология и ультраструктура клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования, различаются. На полноценной питательной среде Эдварда (ППСЭ) *M. gallisepticum* S6 образует грушевидные клетки (длина 0,6-1 мкм), которые имеют четкие цитоскелетоподобные образования и терминальную структуру "bleb". Эти клетки образуют на твердых питательных средах характерные колонии ("fried eggs") и соответствуют типичным вегетативным (пролиферирующим) формам (ВФ) клеток микоплазмы.



На среде с ограничением субстрата и при понижении температуры культивирования *M. gallisepticum* S6 образует кокковидные клетки (диаметр 0,2-0,8 мкм), лишенные полярных образований. Такие клетки имеют конденсированный нуклеоид и электронно-плотную структуру мембран. Цитоскелетоподобные структуры в кокковидных клетках *M. gallisepticum* S6 не визуализируются. При этом некоторые клетки оказываются окруженными капсулоподобными образованиями (рис. 1Б).

На основании данных МПР и определения КОЕ было установлено, что клетки *M. gallisepticum* S6 при статическом культивировании на ППСЭ и в НУ теряют способность к пролиферации и образованию колоний через 15 и 8 суток, соответственно. Однако, по данным ПЦР, а также цитохимических методов и электронной микроскопии, интактность ДНК *M. gallisepticum* S6, а также целостность мембраны клеток микоплазмы при культивировании их в НУ сохраняются на протяжении всего срока наблюдения (180 суток). При этом было обнаружено, что при увеличении срока статического культивирования клеток микоплазмы в НУ происходит уменьшение клеточных размеров и исчезновение класса клеток с линейными размерами 0,8-1 мкм (рис. 2). Подобные уменьшения размера клеток характерны для аспорогенных бактерий, в том числе *A. laidlawii* PG8, при адаптации бактерий к НУ среды, связанной с переходом ВФ клеток в НФ [Головлев, 1998; Чернов и др., 2005].



Полученные нами данные позволяют заключить, что адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ среды, как и ряда аспорогенных бактерий, в том числе *A. laidlawii* PG8, связана с переходом ВФ микоплазмы в НФ. Однако, по данным Чернова с соавт. (2005), клетки *A. laidlawii* PG8 на ППСЭ теряют способность к образованию колоний через 21 сутки, а в НУ среды у части (менее 0,1 %) популяции клеток микоплазмы способность формировать колонии сохраняется на протяжении 380 суток. При этом преобладающим классом популяции адаптированных к НУ среды клеток *A. laidlawii* PG8 является класс кокковидных клеток размером 0,2 мкм и менее (наноклетки и

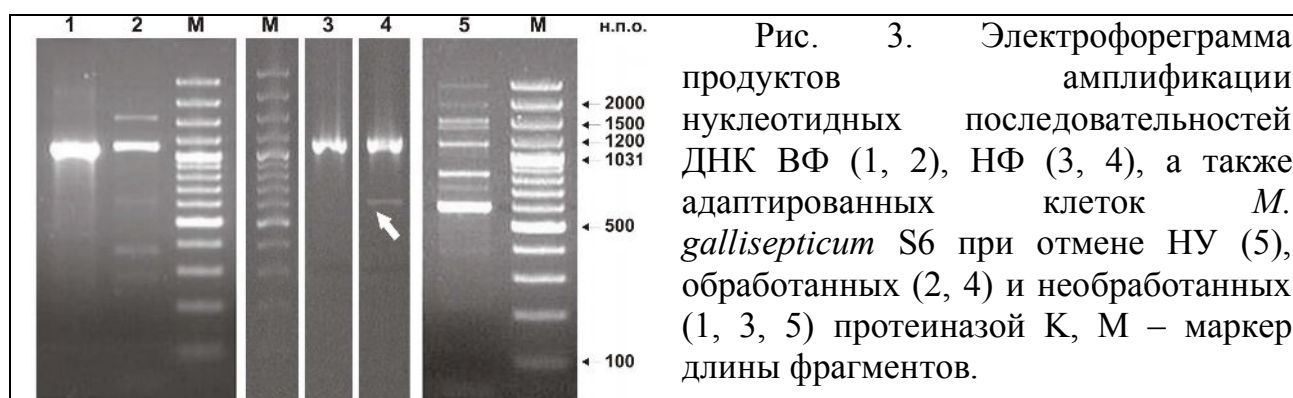
наноформы). Между тем появление клеток размером 0,2 мкм и менее связывают с промежуточной стадией формирования НС у бактерий [Karpelyants *et al.*, 1993]. В наших исследованиях такой класс клеток *M. gallisepticum* S6 появлялся на 16 неделе культивирования микоплазмы в НУ среды, составлял только 19% клеточной популяции и исчезал к 20 неделе статического культивирования бактерий в соответствующих условиях. Полученные нами данные могут свидетельствовать о существенных различиях реактивности клеточных популяций *A. laidlawii* PG8 и *M. gallisepticum* S6 в отношении соответствующих условий среды.

Применение метода "пробуждения" НФ клеток *A. laidlawii* PG8 оказался неэффективным для реверсии НФ *M. gallisepticum* S6 – превращение НФ в типичные ВФ клеток микоплазмы. Известно, что условия пробуждения из некультивируемого в активно пролиферирующее состояние у различных бактерий весьма различаются [Головлев, 1998]. Для НФ некоторых бактерий единственным эффективным способом реверсии является пассаж через восприимчивый организм [Романова, Гинцбург, 1998]. Вероятно, реверсия *M. gallisepticum* S6 требует специфичных факторов, которые еще предстоит определить.

2.2. Особенности амплификации нуклеотидных последовательностей ряда генов клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования

Изменения топологии ДНК бактерий в НУ, ассоциированные в том числе с конденсацией нуклеоида, могут приводить к дифференциальной амплификации нуклеотидных последовательностей некоторых генов клеток микроорганизмов, образующихся в соответствующих условиях среды [Warner, Oliver, 1998]. Этот эффект может вызываться ДНК-связанными белками и проявляться аттенуацией ПЦР-сигнала при использовании матричной ДНК без специальной очистки [Зигангирова и др., 1995].

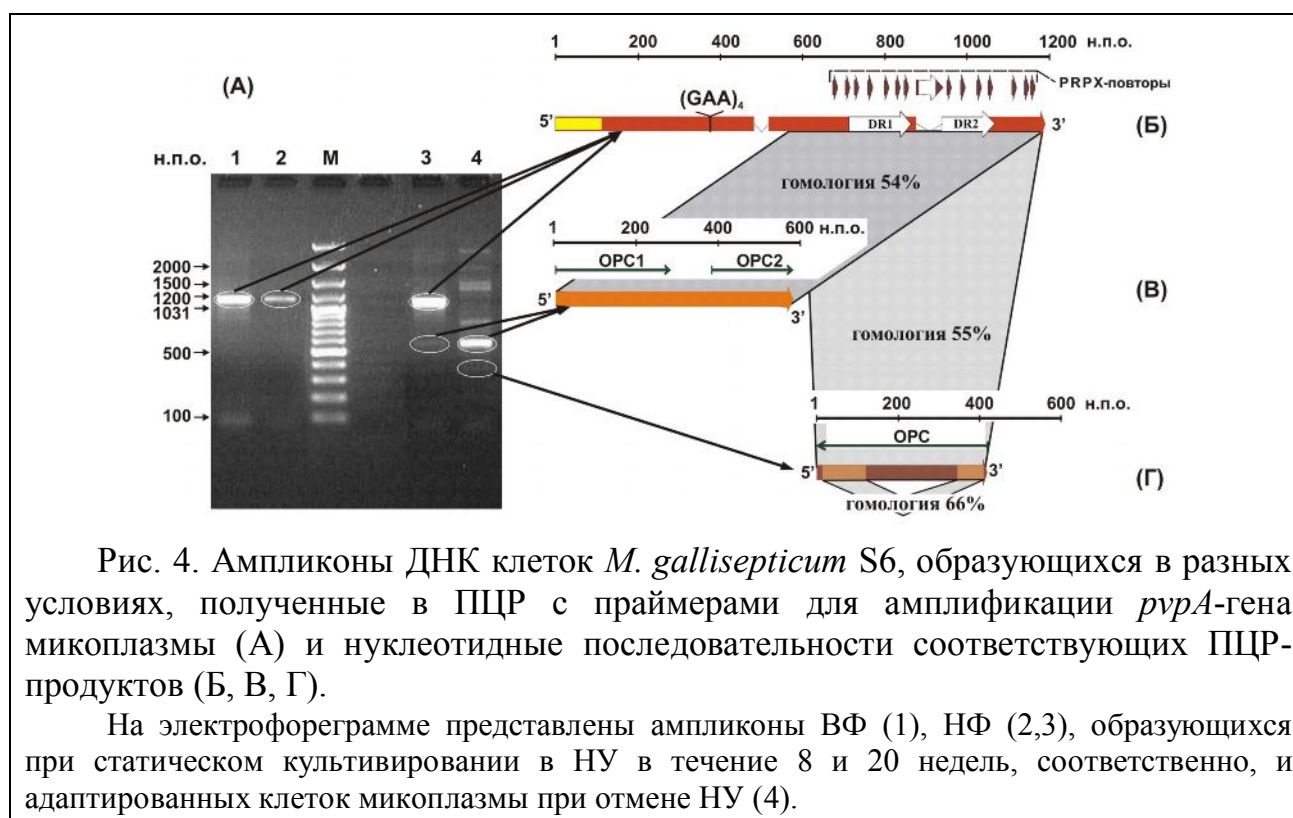
В наших исследованиях дифференциальная амплификация была установлена при использовании в ПЦР специфичных праймеров для амплификации полной нуклеотидной последовательности *rnpA*-гена микоплазмы (рис. 3). Этот эффект был связан, в частности, с появлением у НФ *M. gallisepticum* S6 дополнительного ампликона (рис. 3, дор. 4). Специфичные



праймеры для амплификации нуклеотидной последовательности гена *rvpA* *M. gallisepticum* S6 позволяют определять с помощью ПЦР в тестируемых образцах клетки микоплазмы, образующиеся в разных условиях, – ВФ и НФ.

Образование дополнительного ПЦР-продукта размером 582 н.п.о. при амплификации ДНК НФ *M. gallisepticum* S6 и клеток адаптированной культуры при отмене НУ может свидетельствовать как о появлении дополнительных сайтов отжига праймеров, так и рекомбинационных процессах, связанных с нуклеотидной последовательностью гена *rvpA*, при культивировании клеток микоплазмы в новых условиях. RvpA *M. gallisepticum* является фазовариабельным белком цитоадгезии, подверженным высокочастотным перестройкам [Boguslavsky *et al.*, 2000]. Вариабельность антигенных детерминант белков клеточной поверхности является способом преодоления микоплазмами иммунного контроля организма-хозяина [Yogev *et al.*, 2002]. Вариации обуславливаются структурными перестройками генов соответствующих белков. Такие данные были получены нами в отношении *vaag*-генов клинических изолятов *M. hominis* при сравнительном анализе их нуклеотидных последовательностей [Chernov *et al.*, 2005].

В этой связи нами были определены первичные нуклеотидные последовательности основных и дополнительных ампликонов, возникающих при использовании в ПЦР ДНК клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях (рис. 4). В нуклеотидных последовательностях основных



rvpA-ампликонов размером 1150 н.п.о. ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6 была выявлена ОРС размером 1086 н.п.о., которая на 97% оказалась гомологичной нуклеотидным последовательностям *rvpA*-генов штаммов R и Pendik

M. gallisepticum. Первичная структура гена *pvpA* клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования (ВФ и НФ), оказалась идентичной.

В нуклеотидной последовательности дополнительного ампликона (582 н.п.о.), возникающего у НФ микоплазмы, были выявлены две ОРС, не зарегистрированные в геноме ВФ *M. gallisepticum* R_{low}. Высокая степень гомологии нуклеотидной последовательности соответствующего ампликона с геном *pvpA* (54%) при отсутствии других протяженных гомологичных участков на хромосоме *M. gallisepticum* R позволяет предполагать, что *pvpA*-ген может быть *основой* для формирования новых участков в геноме микоплазмы.

В литературе имеются данные, что адаптация организмов (про- и эукариот) к новым условиям окружающей среды может быть связана с внутригеномными рекомбинационными перестройками, определяющими образование новых нуклеотидных последовательностей, а также генов [Гогвадзе, Буздин, 2005; Гогвадзе и др., 2005; Torkelson *et al.*, 1997; Esnault *et al.*, 2000]. Однако молекулярные механизмы соответствующего явления у *M. gallisepticum* S6 еще предстоит выяснить.

2.3. Сравнительный анализ полипептидов клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования

В результате сравнительного анализа полипептидов клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования, было установлено, что адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ сопровождается существенным изменением экспрессии белков в клетках микоплазмы (табл. 1). Количественный и качественный состав полипептидных пулов ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6 весьма различается. Различия связаны как с редукцией, так и индукцией экспрессии продуктов ряда генов, а также появлением в клетках НФ микоплазмы изоформ белков. У НФ микоплазмы наблюдается тенденция к смещению значительного количества белков в кислую область.

Всего в результате сравнительного анализа полипептидных спектров ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6 было идентифицировано 63 белка, участвующие в адаптации клеток микоплазмы к НУ.

Образование изоферментов, участвующих в энергетическом метаболизме в НФ клеток, может способствовать оптимизации катализа реакций в клетках бактерий в НУ среды [Хочачка, Сомеро, 1988]. При этом чрезвычайно высокое в НФ *M. gallisepticum* S6 разнообразие изоформ адгезинов (в том числе PvpA), отличающихся не только по pH, но и по массе, может быть универсальной защитной реакцией микоплазм, связанной с усилением адгезии бактерий к клеткам хозяина под действием стрессовых факторов [Wasinger *et al.*, 2000].

Полученные нами данные свидетельствовали, что в НФ клеток *M. gallisepticum* S6 сохраняется значительная часть ферментов гликолитического пути. При этом наличие изоформ соответствующих ферментов позволяет предполагать, что одним из путей, активирующихся в клетках *M. gallisepticum* S6 при культивировании их в НУ среды, является

Табл. 1.

Идентифицированные белки, экспрессия которых значительно изменяется при адаптации *M. gallisepticum* S6 к НУ

Белок	Локус ОРС на хромосоме	Белок	Локус ОРС на хромосоме
ch_1510	MGA_0123	ch_1066	MGA_0649
PykF *	MGA_0156	ch_1080	MGA_0674
AcoB *	MGA_0164	ch_1080 (N-конец)	MGA_0674
AcoA *	MGA_0165	PstS	MGA_0687
ch_1566	MGA_0226	Tsf *	MGA_0782
uh_1572	MGA_0241	NusA	MGA_0818
uh_1579 *	MGA_0252	PutA *	MGA_0860
PvpA *	MGAL_0256_0258	ch_1190	MGA_0868
EF-G	MGA_0260	ch_1200	MGA_0879
DnaK *	MGA_0279	Smc-like *	MGA_0917
ch_1601	MGA_0306	MGC3 *	MGA_0939
GAPDH*	MGA_0330	GreA	MGA_0958
VlhA 3.03 *	MGA_0380	TufB *	MGA_1033
MALLP *	MGA_0398	ch_1301	MGA_1083
ch_1660	MGA_0416	ch_1316	MGA_1110
ch_1670	MGA_0431	Pgk *	MGA_1187
RpoA *	MGA_0443	ch_1369	MGA_1199
ch_1709	MGA_0495	ch_1371	MGA_1208
Fba	MGA_0498	ch_1381	MGA_1224
GTPase	MGA_0500	GrpE	MGA_1232
PtsA *	MGA_0508	DnaJ	MGA_1324d

- экспрессирован у НФ, но не у ВФ; - не экспрессирован у НФ, или экспрессия понижается; * - белок представлен изоформами у НФ; ch / uh – консервативный/уникальный гипотетический белок

глюконеогенез. Неуглеводными компонентами, определяющими функционирование этого пути, могут быть аминокислоты и, в меньшей степени, липиды, высвобождающиеся при лизисе части клеток популяции. Интенсификация глюконеогенеза обеспечивает синтез необходимого пула сахаров, в том числе для формирования капсулоподобных структур *M. gallisepticum* S6 (рис. 1Б), способствующих выживанию клеток бактерий в НУ [Степанова и др., 2001]. На основании полученных экспериментальных

данных и анализе их *in silico* составлена схема возможных перестроек метаболических путей в клетках *M. gallisepticum* S6 при адаптации к НУ.

2.4. Особенности генотоксичности клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования

Адаптация микроорганизмов к действию различных стрессорных факторов может определять значительные изменения метаболизма и вирулентности бактериальных клеток [Хмель, 2005; Чернов и др., 2007], в том числе связанные с секрецией специфических метаболитов, обладающих мутагенной [Ильинская и др., 2002] или антимутагенной активностью [Воробьева и др., 1993].

В результате наших исследований было обнаружено, что адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ сопровождается изменением генотоксичных свойств клеток микоплазмы и их культуральной жидкости (рис. 5).

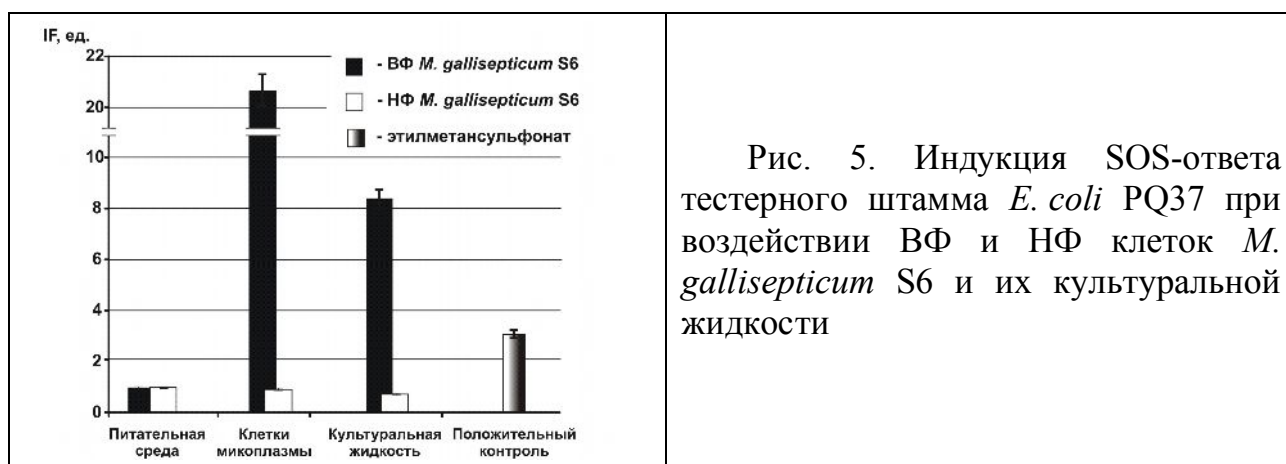


Рис. 5. Индукция SOS-ответа тестерного штамма *E. coli* PQ37 при воздействии ВФ и НФ клеток *M. gallisepticum* S6 и их культуральной жидкости

Клетки *M. gallisepticum* S6, образующиеся на полноценной питательной среде, а также их культуральная жидкость индуцируют SOS-ответ у клеток тестерного штамма *E. coli* PQ37. Клетки *M. gallisepticum* S6, образующиеся в НУ, а также их культуральная жидкость генотоксичных эффектов не проявляют.

Отсутствие SOS-ответа у клеток тестерного штамма *E. coli* PQ37 при воздействии НФ и их культуральной жидкости может свидетельствовать, что у *M. gallisepticum* S6, как и у ряда других аспорогенных бактерий, при адаптации к НУ происходит аттенуация вирулентных свойств, связанных с генотоксичными эффектами. Проявление генотоксичных эффектов как у ВФ, так и у культуральной жидкости этих клеток в отношении *E. coli* PQ37, позволяет предположить секрецию генотоксичных метаболитов из клеток микоплазмы в окружающую среду и/или изменения компонентов культуральной среды под действием секретируемых метаболитов ВФ *M. gallisepticum* S6. Природа этих метаболитов представляет особенный интерес с точки зрения патогенного потенциала этой широко распространенной микоплазмы в отношении инфицированных клеток хозяина и микроорганизмов в микробиоценозах [Hudson *et al.*, 2006].

2.5. Фитопатогенность *M. gallisepticum* S6 и ее особенности у клеток микоплазмы, образующихся в разных условиях культивирования

M. gallisepticum – широко распространенный возбудитель респираторных микоплазмозов птиц, контаминант создаваемых на основе куриных эмбрионов вирусных вакцин [McGarrity *et al.*, 1992]. Вместе с тем в литературе имеются данные о выявлении *M. gallisepticum* у растений [Коромыслов и др., 1987]. Однако сообщения об исследованиях влияния инфекции *M. gallisepticum* на развитие деструктивных процессов в тканях растений в литературе отсутствуют. В этой связи выяснение способности клеток *M. gallisepticum* S6, образующихся в разных условиях культивирования (ВФ и НФ), инфицировать растения специфичного и неспецифичного индикаторов фитомикоплазмозов – барвинка малого (*Vinca minor* L.) и фасоли золотистой (*Vigna radiata* L.), соответственно, и вызывать у них морфофизиологические и ультрацитоструктурные изменения явилось задачей наших исследований.

Определение фитопатогенности у *M. gallisepticum* S6 выполняли с использованием алгоритма, разработанного для проведения соответствующих исследований в отношении *A. laidlawii* PG8 [Чернов, 1998; Чернов и др., 2007]. Для выявления ВФ и НФ *M. gallisepticum* S6 в тканях растений использовали методы трансмиссивной микроскопии [Чернов и др., 1996], а также полимеразной цепной реакции [Чернов и др., 2007] с праймерами, сконструированными на основе нуклеотидной последовательности гена *himA/hup*, кодирующего НУ-белок (heat-unstable nucleoid protein) штамма *M. gallisepticum*, для которого нами было установлено отсутствие аттенуации ПЦР-сигнала при адаптации клеток микоплазмы к НУ среды.

В результате наших экспериментов было обнаружено, что заражение *V. minor* L. клетками *M. gallisepticum* S6 вызывает у 100 % опытных растений *аппаратную* инфекцию с типичной картиной морфозов, возникающих у растений при инфицировании их фитопатогенными микоплазмами.

Заражение *V. radiata* L. клетками *M. gallisepticum* S6 приводило к развитию *латентной* микоплазменной инфекции. В результате анализа 90 образцов 18-ти дневных проростков растений (*V. radiata* L.) *выраженные* морфологические аномалии, характерные для фитомикоплазмозов (апикальный некроз, карликовость, скручивание листьев, развитие боковых побегов), не были обнаружены. Только у единичных растений был отмечен некроз краевой пластинки листа и слабые проявления хлороза. Однако результаты ПЦР-анализа свидетельствовали о присутствии ДНК *M. gallisepticum* S6 в клетках тканей (корень, стебель, лист) *всех* растений опытной группы. В результате исследования трансмиссивных микрографий было установлено, что инфицирование *V. radiata* L. клетками НФ *M. gallisepticum* S6 вызывает характерные для фитомикоплазмозов изменения в тканях растений. При этом выраженность деструктивных процессов у растений, инфицированных ВФ и НФ микоплазмы, различается.

В растениях, зараженных ВФ микоплазмы, наблюдаются изменения в ультраструктуре клеток околососудистой паренхимы (рис. 6А, Б). Хлоропласты в клетках паренхимы имеют светлый матрикс, тилакоиды расположены рыхло,

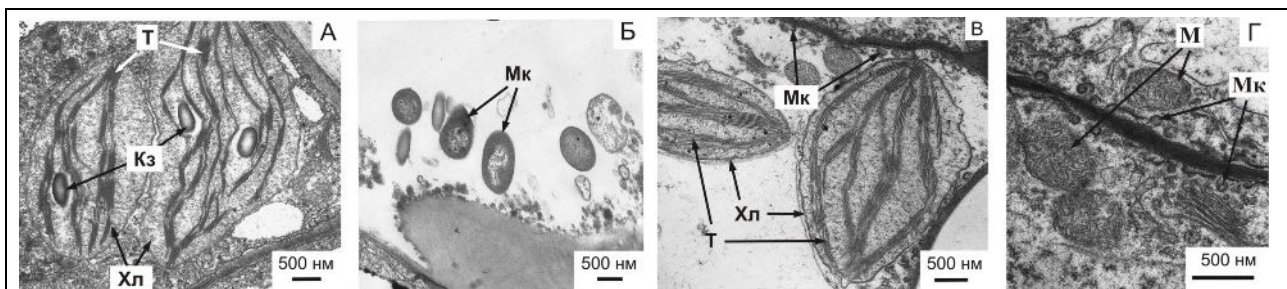


Рис. 6. Трансмиссивные микрофотографии клеток растений (*V. radiata* L.), инфицированных ВФ (А, Б) и НФ (В, Г) *M. gallisepticum* S6

Кз – крахмальные зерна, Мк – микоплазмы, М – митохондрии, Т – тилакоиды, Хл – хлоропласты

образуют стопки из 3-5 гран, между которыми локализованы небольшие крахмальные зерна (рис. 6А). Митохондрии имеют извилистую форму и светлую, лишенную крист, область матрикса. В трахеидах обнаруживаются единичные клетки микоплазмы размером 0,6-0,8 мкм (рис. 6Б).

В растениях, зараженных НФ *M. gallisepticum* S6, ультраструктура клеток проводящего пучка полностью нарушена и наблюдается деградация всех органелл (рис. 6В, Г). В зараженных клетках не просматривается плазматическая мембрана, нарушена плотность цитоплазмы. Ядро в зараженных микоплазмой клетках паренхимы имеет очень рыхлую гиалоплазму. В хлоропластах отсутствуют крахмальные зерна, упаковка тилакоидов рыхлая, а строма светлая (рис. 6В). Подобная ультраструктура хлоропластов отражает снижение их функциональной активности при развитии хлороза, характерного для фитомикоплазмозов [Christensen *et al.*, 2005]. Клетки губчатой паренхимы листа еще сохраняют свою ультраструктурную организацию, тогда как граничащие с ними паренхимные клетки обкладки пучка полностью разрушены. По краю клеточной стенки обнаруживается большое количество мелких кокковидных клеток микоплазмы, в том числе размером 0,1-0,15 мкм (рис 6В, Г), характерным для наноформ бактерий [Чернов и др., 2007]. Полученные нами результаты позволяют заключить, что *M. gallisepticum* S6 обладает фитопатогенным потенциалом. При этом адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ сопровождается усилением вирулентности микоплазмы в отношении растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большой интерес к молекулярным основам адаптации микоплазм связан, с одной стороны, с уникальностью биологии мельчайших прокариот, а с другой – диктуется практической необходимостью. Микоплазмы – возбудители заболеваний человека, животных, растений, основные контаминанты клеточных культур, в том числе используемых в биотехнологии для производства вирусных вакцин [Борхсениус и др., 2002; Razin, 2006].

Сравнительно недавно были получены данные об особенностях адаптации к НУ *A. laidlawii* PG8 (сем. *Acholeplasmataceae*, кл. *Mollicutes*) [Чернов и др.,

2004, 2005, 2007; Chernov *et al.*, 2007]. В результате нашей работы были выявлены особенности адаптации к НУ представителя другой филогенетической группы молликут – *M. gallisepticum* S6 (сем. Mycoplasmataceae, кл. Mollicutes). Полученные нами данные могут свидетельствовать, что выживание в новых условиях клеток *M. gallisepticum* S6 связано с репрограммированием клеточной и молекулярной биологии микоплазмы. Адаптация *M. gallisepticum* S6, как и *A. laidlawii*, а также ряда аспорогенных бактерий, связана с переходом ВФ клеток микоплазмы в НФ. Однако реактивность клеток *A. laidlawii* PG8 и *M. gallisepticum* S6 в отношении НУ различается. Одной из причин этого могут быть существенные различия биологии *M. gallisepticum* и *A. laidlawii*, - микоплазм, принадлежащим к разным филогенетическим группам молликут [Oshima, Nishida, 2007].

M. gallisepticum способна успешно преодолевать защитные системы высших организмов и выживать в разных условиях среды [Nagatomo *et al.*, 2001; Collett, 2005]. Эта микоплазма, известная как возбудитель заболеваний птиц и контаминант вирусных вакцин, создаваемых на основе куриных эмбрионов, встречается также у растений. Однако данные о фитопатогенности этой микоплазмы в литературе отсутствуют.

В нашей работе впервые с точки зрения критериев вирулентности (инфекционность, инвазивность, токсигенность и персистенция) было показано, что *M. gallisepticum* S6 способна проявлять фитопатогенность в отношении как специфического, так и неспецифического индикаторов фитомикоплазмозов. *M. gallisepticum* S6 может проникать через корневую систему растений, распространяться по разным тканям, персистировать в них и вызывать деструктивные процессы, характерные для фитомикоплазмозов, возникающих спонтанно [Скрипаль, 1988]. При этом было обнаружено, что НФ *M. gallisepticum* S6, не вызывающие (в отличие от ВФ микоплазмы) токсичных и мутагенных эффектов в отношении тестерного штамма *E. coli* PQ37, являются более фитопатогенными, чем ВФ клеток бактерии.

Наличие у *M. gallisepticum* S6 механизмов смены программ жизни, определяющих адаптацию микоплазмы к разным условиям среды и изменение вирулентных свойств, диктует необходимость разработки новых подходов для исследования формирования и эволюции системы "патоген-хозяин", а также способов ее контроля.

В результате наших исследований предложен способ выявления ВФ и НФ клеток *M. gallisepticum* S6 с помощью ПЦР при использовании праймеров для амплификации нуклеотидной последовательности гена *rvrA* микоплазмы. Этот способ может быть эффективным средством дифференциальной детекции ВФ и НФ *M. gallisepticum* в природных источниках. Однако решение проблемы контроля микоплазменных инфекций, вероятно, лежит на пути геномно-протеомного профилирования микоплазм и клеток эукариот при их взаимодействии. Реализация таких проектов уже началась как за рубежом, так и в России [Чернов, 2007, 2008; Wang *et al.*, 2006; Cecchini *et al.*, 2007; Madsen *et al.*, 2008].

ВЫВОДЫ

1. Адаптация *M. gallisepticum* S6 к неблагоприятным условиям (НУ) сопровождается изменениями морфологии, ультраструктуры, а также пролиферации клеток микоплазмы. На полноценной питательной среде Эдварда *M. gallisepticum* S6 образует грушевидные клетки (длина 0,6-1 мкм), имеющие терминальную структуру "bleb", а на среде с ограничением субстрата, при понижении температуры культивирования – кокковидные клетки (диаметр 0,2-0,8 мкм), лишенные полярных образований. Длительное культивирование *M. gallisepticum* S6 в НУ приводит к превращению вегетативных форм (ВФ) клеток микоплазмы в некультивируемые формы (НФ).

2. При адаптации клеток *M. gallisepticum* S6 к НУ в структуре ДНК микоплазмы возникают изменения. У НФ определяется нуклеотидная последовательность (582 н.п.о.) с двумя ОРС, не регистрируемая у ВФ микоплазмы.

3. ДНК-связанные белки НФ клеток *M. gallisepticum* S6 могут обуславливать аттенуацию амплификации нуклеотидной последовательности (582 н.п.о.) при использовании в ПЦР со специфичными праймерами для выявления *rvpA*-гена микоплазмы матричной ДНК без специальной очистки.

4. Клетки *M. gallisepticum* S6, образующиеся в разных условиях культивирования, существенно различаются по экспрессированным белкам. Идентифицировано 63 белка, участвующие в адаптации клеток микоплазмы к НУ. На основании полученных данных представлены возможные схемы изменения метаболических путей в клетках НФ микоплазмы.

5. Адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ сопровождается изменением генотоксичных свойств клеток микоплазмы и их культуральной жидкости. ВФ клеток *M. gallisepticum* S6, а также их культуральная жидкость индуцируют SOS-ответ у клеток тестерного штамма *E. coli* PQ37. НФ клеток микоплазмы, а также их культуральная жидкость генотоксичных эффектов не проявляют.

6. *M. gallisepticum* S6 обладает фитопатогенным потенциалом. Клетки микоплазмы способны инфицировать растения через корневую систему, проникать в разные ткани растений, персистировать в них и вызывать деструктивные процессы, характерные для фитомикоплазмозов. При этом заражение клетками *M. gallisepticum* S6 *V. minor* L. (специфичный индикатор фитомикоплазмозов) вызывает у растений аппаратную инфекцию, а заражение *V. radiata* L. (неспецифичный индикатор фитомикоплазмозов) приводит к развитию латентной инфекции.

7. Адаптация *M. gallisepticum* S6 к НУ сопровождается изменением вирулентности микоплазмы в отношении растений. НФ *M. gallisepticum* S6 индуцируют более выраженные нарушения ультраструктуры тканей растений (*V. radiata* L.), чем ВФ микоплазмы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Баранова Н.Б. Персистенция микоплазм у человека: полиморфизм генов адгезии (*vaa*) *Mycoplasma hominis* и цитокинов (*IL-1*, *IL-10*) у носителей микоплазмы / Н.Б.Баранова, А.А.Музыкантов, О.В.Горшков, Г.Ф.Шаймарданова // "Молодые ученые в медицине" XII Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 150-летию со дня рождения В.М. Бехтерева: Тез. докл. – Казань: Отечество, 2007 – С.275-276.
2. Баранова Н.Б. Молекулярные основы персистенции микоплазм у человека: гены *vaa* у клинических изолятов *Mycoplasma hominis* и *IL* (1, 10) у носителей микоплазмы / Н.Б.Баранова, А.А.Музыкантов, Г.Ф.Шаймарданова, О.В.Горшков // "Фундаментальные аспекты исследования симбиотических систем", Всероссийская конференция с международным участием: Тез. докл. – Саратов, 2007. – С.35.
3. Музыкантов А.А. Молекулярно-генетические и морфофизиологические особенности клеток микоплазм (*Mycoplasma gallisepticum*) при использовании различных источников энергии / А.А.Музыкантов, Г.Ф.Шаймарданова, О.В.Горшков // "Биология – наука XXI века" 11-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых: Сб. тез. – Пущино: Изд-во Пущинского научного центра, 2007. – С.102.
4. Баранова Н.Б. Особенности вариабельности генов *vaa* у клинических изолятов *Mycoplasma hominis* и *IL* (1, 10) у носителей микоплазмы / Н.Б.Баранова, А.А.Музыкантов, Г.Ф.Шаймарданова, О.В.Горшков // "Биология – наука XXI века" 11-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Сб. тез. – Пущино: Изд-во Пущинского научного центра, 2007. – С.69-70.
5. Чернов В.М. Сравнительный протеомный анализ вегетативных форм клеток и наноформ микоплазм (*Mycoplasma gallisepticum* S6 и *Acholeplasma laidlawii* PG8) / В.М.Чернов, В.М.Говорун, И.А.Демина, О.В.Горшков, А.А.Музыкантов и др. // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Сб. тез. – Новосибирск: Арта, 2008. – С.255.
6. Чернов В.М. Адаптация микоплазм к неблагоприятным условиям роста связана с превращением вегетативных форм клеток в наноформы / В.М.Чернов, О.А.Чернова, О.В.Горшков, Г.Ф.Шаймарданова, А.А.Музыкантов и др. // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Сб. тез. – Новосибирск: Арта, 2008. – С.144.
7. Чернов В.М. Сравнительный протеомный анализ вегетативных форм и наноклеток *Mycoplasma gallisepticum* для создания технологии контроля микоплазменных инфекций / В.М.Чернов, О.А.Чернова, М.Н.Давыдова, О.В.Горшков, М.В.Трушин, Г.Ф.Шаймарданова, А.А.Музыкантов и др. // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2007 год в рамках приоритетного направления "Живые системы". Сб. тез. – Москва, 2007. – С.87-88.
8. Музыкантов А.А. Феноменология микоплазменных инфекций растений: особенности ультраструктуры клеток *Vigna radiata* L.,

инфицированных *Mycoplasma gallisepticum* S6 / А.А.Музыкантов, Е.Н.Антуфьева, А.А.Пономарева // "Биология: традиции и инновации в XXI веке": Материалы I Всероссийского конгресса студентов и аспирантов-биологов "Симбиоз Россия-2008" с международным участием. / Под научной редакцией Т.В. Балтиной. – Казань: Изд-во КГУ, 2008. – С.21.

9. **Музыкантов А.А.** Изменение вирулентных свойств микоплазм (*Mycoplasma gallisepticum* S6) при адаптации к стрессорам / А.А.Музыкантов, А.Д.Пельникевич // "Биология: традиции и инновации в XXI веке: Материалы I Всероссийского конгресса студентов и аспирантов-биологов "Симбиоз Россия-2008" с международным участием. 6-10 июля 2008 г. / Под научной редакцией Т.В. Балтиной. – Казань: Изд-во КГУ, 2008. – С.67-71.

10. Чернов В.М. Адаптация микоплазм к неблагоприятным условиям роста: морфология, ультраструктура и экспрессия генома клеток *Mycoplasma gallisepticum* S6 / В.М.Чернов, В.М.Говорун, И.А.Дёмина, О.В.Горшков, **А.А.Музыкантов** и др. // ДАН. – 2008. – Т. 421. – С.701-704.

11. Чернов В.М. Адаптация *Mycoplasma gallisepticum* к неблагоприятным условиям роста: изменение морфологических и физиологических свойств / В.М.Чернов, О.А.Чернова, О.В.Горшков, **А.А.Музыкантов** и др. // Микробиол. – 2008. – Т. 77. – № 6.

12. Chernova O.A. *Mycoplasma gallisepticum* strain S6 surface cytodhesin (*pvpA*) gene, complete cds. ACCESSION EU847585. / O.A.Chernova, O.V.Gorshkov, A.A.Mouzykantov, V.M.Chernov // Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=EU847585>, свободный. – Проверено 25.08.2008.

Список сокращений и условных обозначений

ВФ	–	вегетативные формы
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	–	колониеобразующие единицы
мкм	–	микрометр
МПР	–	метод предельных разведений
н.п.о.	–	нуклеотидные пары оснований
НУ	–	неблагоприятные условия
НФ	–	некультивируемые формы
ОРС	–	открытая рамка считывания
ППСЭ	–	полноценная питательная среда Эдварда
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
PvpA	–	фазовариабельный белок А (<u>p</u> hase <u>v</u> ariable <u>p</u> rotein <u>A</u>)
Vaa	–	вариабельный антиген, участвующий в адгезии (<u>v</u> ariable <u>a</u> dherence- <u>a</u> ssociated antigen)